

AADC 欠損症の血清酵素学的診断

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学医学部 小児科学 教授
研究協力者 青木志保¹、牛島健太郎²、藤村昭夫²、山形崇倫¹
¹自治医科大学小児科学、²臨床薬理学

研究要旨

芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症；AADC 欠損症は、本邦においては 4 例診断されているのみであり、診断のついていない症例が多いものと考えられる。早期診断法確立のため、血清を用いた酵素診断の確立を目指し、酵素活性測定系を立ち上げた。これにより血清を用いた、国内における診断を目的とした酵素活性測定が可能となった。今後は、更にハイスルーブットな一次スクリーニングの解析系の開発を進め、遺伝子検索と合わせ、早期診断のシステムの確立を進める。

A . 研究目的

アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）は遺伝性疾患治療において、現在最も有望視されている遺伝子治療のベクターであり、本研究班では、AAV ベクターを用いたアミノ酸脱炭酸酵素欠損症；Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)欠損症に対する、遺伝子治療臨床研究を進めている。AADC は L- DOPA から Dopamine、および

5-Hydroxy Tryptophan(5HTP) から Serotonin への 5-hydroxy indolacetic acid (HIAA) の脱炭酸化に関わる酵素であり、モノアミン代謝、プテリジン代謝の最終経路に関わる（図 1）Dopamine からは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。本症では髄液で、Dopamine の前駆体の L-dopa およびその代謝物である 3-O-methyldopa(MD)、Serotonin の前駆体である 5-HTP が著増するとともに Dopamine の代謝物である Homovalanic acid (HVA)および Norepinephrine の代謝物である 3-mthoxy-4-hydroxyphnylglycol (PHPG) および Serotonin の代謝物である 5-HIAA の減少により診断し、遺伝子診断ないし酵素活性測定により確定する。これらの化合物のうち国内で測定可能なのは、L-dopa、HVA、PHPG、5-HIAA であり

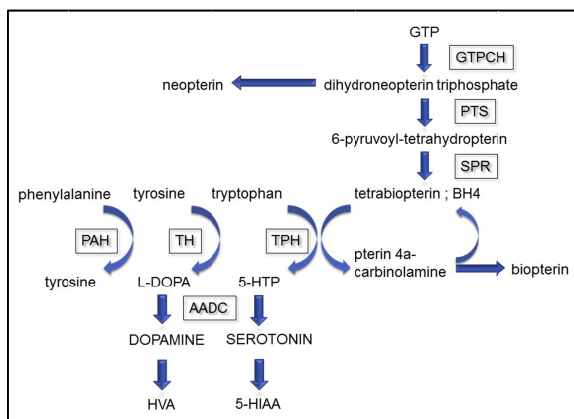


図 1 モノアミン・プテリジン代謝経路
AADC はこれらの系の最終経路にあたる

5-HTP, 3-O-MD は測定できない。また酵素活性の測定は、組織から蛋白抽出後に、活性を測定する研究レベルでの解析がなされているに過ぎない(図2 (Ichinose et al., Anal Biochem 1985)。今回血清を用いた、より簡便な酵素活性測定 (Verbeek et al., MGM 2006)を行い、我々が経験した AADC 患者の血液を用い、AADC 活性を測定した。

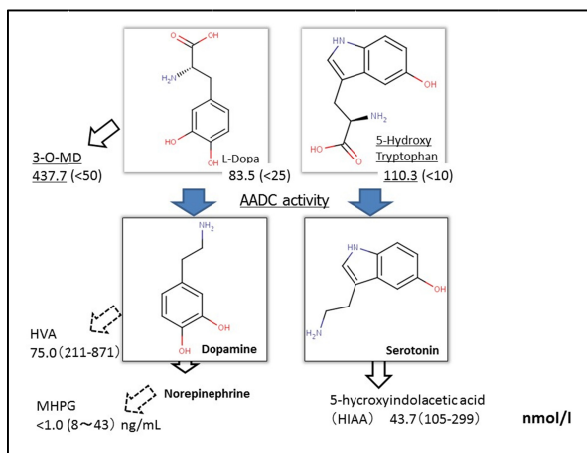


図2 本症例の化合物プロフィール
(下線部は測定を国外に依頼)

B. 対象・方法(概要)

対象; 4才女児。ADDC欠損症の原因遺伝子であるDDCにc.315G>C, p.W105C(母親由来)およびc.385C>T, p.P91S(父親由来)を認めている。報告されて

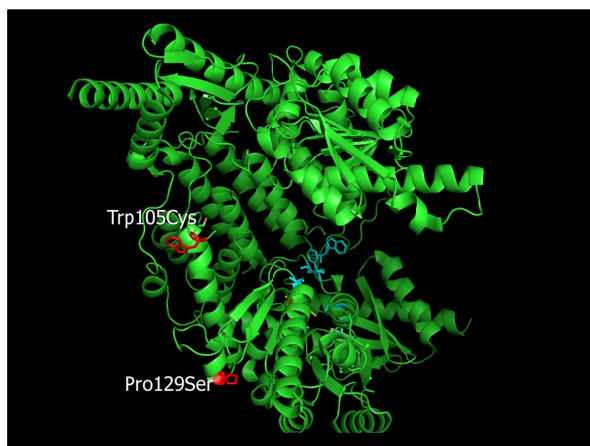


図3 本症例に認めたアミノ酸変異。中心部の側鎖を示すアミノ酸が酵素活性中心部位

いる、結晶構造(Giardina et al., PNAS 2011)からは、変異アミノ酸は活性中心から離れており、活性に大きな影響をあたえることは考えにくい(図3)。髄液中モノアミン値は、L-DOPA 83.5(正常値<25 nmol/l)、3-O-MD437.7(<50)、5-HTP110.3(<10)と著増し、5-HIAA; 43.7(105-299)、HVA; 75.0(211-871)と減少しており、AADC活性低下に合致している。また血漿中AADC酵素活性値測定は、チューリッヒ大学小児病院に依頼し、3.62 pmol/min/ml(正常値36-129)と下限値の約10%であり、診断が確定している。患者より、同意を得た後、2ml採血し血液を分離し活性測定に用いた。

方法; 血清 150 μl に 0.7mM Pyridoxal-5-phosphate 150 μl と 167mM Phosphate buffer (pH7.0) 900 μl を混合し、37℃で2時間インキュベートし基質として

20mM L-dopa 300 μl を加えた。37℃で2時間インキュベートし Perchloric acid 120 μl を加え反応を停止し、内部コントロールとして 100ng/ml DHBA(internal standard) を 100 μl 加え、3500rpm にて5分間遠心し、カテコラミン抽出キット(Thermo Fisher Scientific Inc、MA)を用い、カテコラミンを抽出し、Acclaim 120 C18 Reversed-Phase LC Column (4.6X150mm) を接続した HPLC (日本分光、LC-2000) を用い、電気化学検出器(Thermo Fisher Scientific Inc、Couochem II)にて検出し、DHBAを内部標準として正常コントロールに対する比として算出した。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学附属

病院遺伝子治療臨床研究審査委員会、自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

対象患者は未成年であり、かつ発語がないために意志の確認はできない。よって、患者の保護者に十分に効果とリスクを説明した上で、文書でのインフォームドコンセントを得て実施する。

C. 結果

AADC 活性患者/正常対照は 0.242 ± 0.061 (Mean+SEM) となり、ほぼ正常活性の24%低下を確認できた。

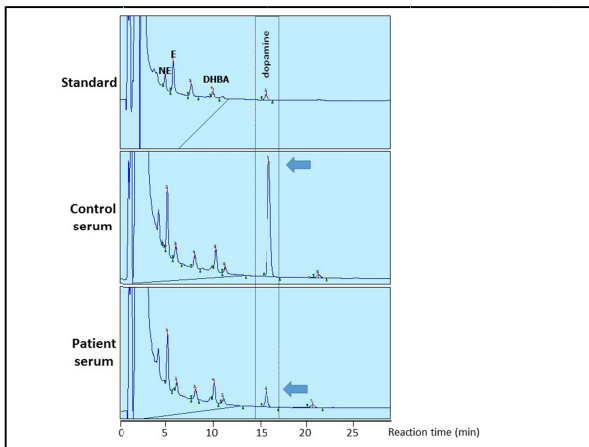


図4 血漿中の AADC による L-DOPA の Dopamine への分解。 が Dopamine に対応するピークであり、面積比(患者/正常コントロール)が非活性を示す。

E, Epinephrine; NE, Norepinephrine; DHBA, 3,4-dihydroxybenzylaminehydrobromine

D. 考察

現在 AADC 欠損症は臨床症状で疑われ、一部の髄液化合物検査と、AADC 遺伝子検査にて行われているが、遺伝子変異が証明されない例が存在するため、これらの症例に対して酵素活性測定による確定診断が重要である。また機能的評価としての酵素活性診断は、重症度、予後、治療選択に需要である。今回国内における、血清を用いた AADC 活性測定の系を立ち上げることができた。

E. 結論および今後の展開

AADC 欠損症患者の、示す症状は非特異的であり、今後遺伝子治療を標準治療と確立するためには、平行して早期診断のシステムを整える必要がある。エクソームシーケンスにより、診断される症例が今後も拡大する可能性はあるが、費用的にも高額なため当面は限られた症例となると考えられる。発達遅滞や、低緊張のような、比較的高頻度に認められる症状に対して、一次スクリーニングを行い、それらの中で可能性が高い症例に関して、二次スクリーニングとして、遺伝子検査や今回確立した AADC の酵素活性は確定診断に重症度予測、薬物治療と遺伝子治療の選択に有効である。また 3-O-MD は髄液のみならず、血漿中でも増加しており、質量分析計を用いたスクリーニングの報告があり、国内での整備が待たれる。この検査法はハイスループット化が可能であり (Chen et al., CCA, 2014)、一次スクリーニングに適しており、次年度の課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Hum Genet 2014; 133: 225-34

2) Akiyama T, Osaka H, Shimbo H,

Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep.* 2014; 12: 65-9

3) Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. *Pediatr Neurol.* 2014; 50: 417-20

4) Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab Report.* 2014; 1:133-138.

5) Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol.* 2014;50:99-100.

6) Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet.* 2014;59:471-4.

7) Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating

leukoencephalopathies. *Neurology.* 2014;82:2230-7.

8) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology.* 2014;82:1587-96.

9) van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* in press.

10) Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.* 2014;261:752-8.

11) Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia.* 2014;55:e13-7.

12) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1

Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. Stem Cell Reports. 2014;2:648-61.

13) Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. Brain Dev. In press.

14) Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. J Hum Genet. In press.

15) Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. Brain Dev. In press.

16) Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saitsu H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen 1 Mutation and Schizencephaly. Magn Reson Med Sci. in press.

2. 学会発表

1) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Ohtake A, Noriko Aida N. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mitochondrial Medicine 2014: Pittsburgh, PA June 4-7, 2014.

1) 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子,

奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 中村和幸, 才津浩智, 小坂仁, 山下純正: 重度精神遅滞, 難治性てんかんの臨床像を示し, PIGO 遺伝子変異が同定された 1 例. 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

2) Osaka H, Tsuyusaka Y, Iai M, Yamashita S, Shimozawa N, Eto Y, Hiroto Saitsu H: Whole exome sequencing reveals molecular basis of childhood cerebellar atrophy. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

3) Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T.: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第 64 回アメリカ人類遺伝学会 2014.10.18-22 サンディエゴ

4) 露崎悠, 井合瑞江, 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 高野亨子, 小坂仁, 山下純正, 才津浩智: 治療可能な小脳失調: Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

5) 宮内彰彦, 門田行史, 池田尚広, 川原勇太, 長嶋雅子, 小坂仁, 杉江秀夫, 森本哲, 渡辺浩史, 下泉秀夫, 下澤伸行, 山形崇倫: 当院における副腎白質ジストロフィー 6 例の臨床的検討. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

H. 知的所有権の取得状況

なし。